

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**Karina de Carvalho da Silva**

**EFEITOS DA REPOSIÇÃO NUTRICIONAL SOBRE O  
CRESCIMENTO SOMÁTICO E ÓSSEO DE RATOS DESNUTRIDOS  
PRECOCEMENTE**

**Recife**

**2009**

**Karina de Carvalho da Silva**

**EFEITOS DA REPOSIÇÃO NUTRICIONAL SOBRE O  
CRESCIMENTO SOMÁTICO E ÓSSEO DE RATOS DESNUTRIDOS  
PRECOCEMENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**Orientadora:**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sílvia Regina Arruda de Moraes.

**Recife**

**2009**

Silva, Karina de Carvalho da

Efeitos da reposição nutricional sobre o crescimento somático e ósseo de ratos desnutridos precocemente / Karina de Carvalho da Silva. – Recife : O Autor, 2009.

68 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição protéica. 2. Reposição nutricional. I.  
Título.

612.39  
612.3

CDU (2.ed.)  
CDD (22.ed.)

UFPE  
CCS2009-138

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

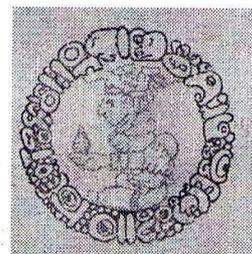
Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva



**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Patologia**



Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE  
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo  
Fone/Fax: (81) 2126.8529  
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>

**AUTOR: KARINA DE CARVALHO DA SILVA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MORFOLOGIA APLICADA**

**NOME DA DISSERTAÇÃO: "INTERFERÊNCIA DA REPOSIÇÃO NUTRICIONAL SOBRE O CRESCIMENTO SOMÁTICO E ÓSSEO DE RATOS DESNUTRIDOS PRECOCEMENTE".**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. SÍLVIA REGINA ARRUDA DE MORAES**

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.**

**DATA: 11 DE AGOSTO DE 2009.**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Profa. LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO**

**Profa. CÉLIA MARIA MACHADO B. DE CASTRO**

**Profa. SIMONE BEZERRA ALVES**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: minha família, especialmente minha mãe Lenides, minha avó Catarina e meus irmãos: Katarina, Meire e Robson exemplos para mim de determinação e persistência. Meus laços eternos!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que sempre esteve presente comigo nos momentos de alegria e também de tristeza, iluminando meus caminhos, ajudando-me a ter força, coragem, determinação e discernimento;

A toda minha família, tias, tios, primos, primas, cunhada que sempre me ensinaram o quanto é importante a união da família, o apoio e o incentivo;

A minha grande amiga Pollie, por toda sua amizade sincera e a quem sou imensamente grata pelo grande incentivo para que eu não desistisse da seleção do mestrado;

A minha amiga Glúvia, pela sua amizade, por ser sempre tão prestativa comigo, me acolhendo em sua casa para nossos estudos e conversas;

A minha amiga Bel, pela sua amizade e pela ajuda na tradução para o inglês do artigo original;

A minha orientadora Sílvia Moraes, por toda sua dedicação e profissionalismo, pela confiança depositada em mim e por mais essa oportunidade de aprendizado;

Aos alunos de graduação: Camilla, Rita, Rafael e Fabiana, “meus queridinhos”, equipe unida que conheci e que muito me ajudou na prática e manejo com os ratos. Muito obrigada pela dedicação, responsabilidade e empenho de todos vocês;

Aos meus amigos Rodrigo e Titina, pela amizade e pela imensa ajuda que me deram quando meus experimentos deram errado;

À Silvânia Paz, pela ajuda na confecção das minhas lâminas;

A todos os meus amigos que sempre torceram por mim, acreditaram em mim e me apoiaram;

Aos meus amigos de mestrado Titina, Alê e Vitor pelo apoio e ajuda que um sempre deu ao outro e pela amizade;

Aos meus amigos de trabalho da UNIVERSO, pela compreensão, apoio e incentivo.

## Resumo

Foram avaliados os efeitos da reposição de uma dieta normoprotéica imposta na fase de crescimento ósseo acelerado sobre o crescimento somático, a placa epifisária e o crescimento ósseo de ratos jovens desnutridos a partir do período de lactação. Foram utilizados ratos machos *wistar* distribuídos aleatoriamente nos grupos: Grupo Nutrido (GN, n=10; filhotes amamentados por nutrizes que receberam dieta normoprotéica, caseína 17%) durante o período de aleitamento e Grupo Desnutrido (GD, n=20; filhotes amamentados por nutrizes que receberam dieta hipoprotéica, caseína 8%) no mesmo período. Após o desmame até o 35º dia de vida, metade dos filhotes do GD passou a receber a dieta normoprotéica (caseína a 17%), constituindo o Grupo Reposição (GR), enquanto a outra metade continuou a receber a dieta hipoprotéica (caseína 8%). Os animais do GN continuaram a receber dieta normoprotéica (caseína 17%). Acompanhou-se a evolução do peso corporal. Aos 36 dias de vida, os animais foram anestesiados, sacrificados e coletados o fêmur e a tíbia direitos. Os ossos foram dissecados, pesados em balança digital e mensurados em toda sua extensão com o auxílio de um paquímetro. Secções longitudinais da epífise proximal do fêmur (5µm) foram coradas com Hematoxilina-Eosina. Foi avaliado o número de condrócitos proliferativo e hipertrófico. Utilizaram-se os testes t-Student e Mann-Whitney, sendo  $p \leq 0,05$ . O peso corporal (g) foi menor nos GD e GR comparados ao GN ( $p < 0,05$ ). Entre GD e GR, o peso corporal foi maior no GR, a partir do 32º dia ( $p < 0,05$ ). O GD apresentou comprimento (mm) do fêmur ( $22,07 \pm 1,03$ ) e da tíbia ( $27,09 \pm 1,03$ ) menor que GN ( $23,95 \pm 0,8$ ) e ( $29,40 \pm 0,46$ ) ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma, o GR apresentou comprimento do fêmur ( $23,30 \pm 0,59$ ) ( $p = 0,031$ ) e da tíbia ( $28,10 \pm 1,05$ ) ( $p = 0,002$ ) menor que o GN. Entre os GD e GR, o comprimento do fêmur foi maior no segundo ( $p = 0,004$ ), mas o comprimento da tíbia não apresentou diferença entre os grupos ( $p = 0,074$ ). O GD apresentou peso do fêmur (g) ( $0,26 \pm 0,03$ ) e da tíbia ( $0,21 \pm 0,03$ ) menor que o GN ( $0,37 \pm 0,03$ ) e ( $0,31 \pm 0,03$ ) ( $p < 0,001$ ). O GR apresentou peso do fêmur ( $0,31 \pm 0,02$ ) e da tíbia ( $0,25 \pm 0,01$ ) menor em relação ao GN ( $p < 0,001$ ). Entre os GD e GR, o peso do fêmur ( $p < 0,001$ ) e da tíbia ( $p = 0,005$ ) foi maior no GR. O número de condrócitos proliferativo foi menor no GD ( $5,71 \pm 0,83$ ) comparado ao GN ( $9,98 \pm 1,06$ ) ( $p < 0,001$ ) e GR ( $8,22 \pm 2,00$ ) ( $p = 0,032$ ). Não houve diferença nessas células entre GN e GR ( $p = 0,222$ ). O número de condrócitos hipertróficos foi menor no GD ( $1,65 \pm 0,84$ ) comparado ao GN ( $4,18 \pm 0,37$ ) ( $p < 0,001$ ) e GR ( $3,25 \pm 0,93$ ) ( $p = 0,021$ ), mas entre GN e GR não houve diferença ( $p = 0,069$ ). A reposição de uma dieta normoprotéica aplicada na fase de crescimento ósseo acelerado minimizou os efeitos da desnutrição sob o crescimento somático e sob o tecido ósseo. Além disso, promoveu um crescimento de recuperação completo com relação ao número de condrócitos.

**Palavras-chave:** desnutrição protéica, crescimento somático, placa epifisária, crescimento ósseo.

## Abstract

Were assessed the effects of a normoproteic diet replacement of imposed during of accelerated bone growth on somatic growth, the epiphyseal plate and bone growth in young rats malnourished from the of lactation period. Were used male *Wistar* rats randomly distributed in groups: Nourished Group (NG, n = 10; breastfed pups by mothers that received normoproteic diet, 17% casein) during the breastfeeding and Malnourished Groups (MG, n = 20; breastfed pups by mothers that received hypoproteic diet, casein 8%) in the same period. After weaning until the 35<sup>th</sup> day of life, half the pupps of MG has received normoproteic diet (casein 17%) constituting the Replacement Group (RG), while the other half continued to received hypoproteic diet (casein 8%). Animals of NG continued to received normoproteic diet (casein 17%). Followed up changes in body weight. At 36 days of life, the animals were anesthetized, sacrificed and it was collected the rights femur and tibia. The bones were dissected, weighed on digital scale and measured throughout its length with pachymeter. Longitudinal sections of the proximal femoral epiphysis (5µm) were stained with Hematoxylin-Eosin. We assessed the number of proliferative and hypertrophic chondrocytes. It was used the test-t Student and Mann-Whitney, for  $p \leq 0,05$ . Body weight (g) was lower in MG and RG compared to NG ( $p < 0,05$ ). Between MG and RG, body weight was bigger in RG, from 32 days ( $p < 0,05$ ). The MG showed femur length (mm) ( $22,07 \pm 1,03$ ) and tibia length ( $27,09 \pm 1,03$ ) lower than NG ( $23,95 \pm 0,8$ ) and ( $29,40 \pm 0,46$ ) ( $p < 0,001$ ). Similarly, the RG showed femur length ( $23,30 \pm 0,59$ ) ( $p = 0,031$ ) and tibia length ( $28,10 \pm 1,05$ ) ( $p = 0,002$ ) lower than NG. Between MG and RG, femur length was bigger in the second ( $p = 0,004$ ), but tibia length showed no difference between groups ( $p = 0,074$ ). The MG showed femoral weight (g) ( $0,26 \pm 0,03$ ) and tibia weight ( $0,21 \pm 0,03$ ) lower than NG ( $0,37 \pm 0,03$ ) and ( $0,31 \pm 0,03$ ) ( $p < 0,001$ ). The RG showed femur weight ( $0,31 \pm 0,02$ ) and tibia weight ( $0,25 \pm 0,01$ ) lower in the NG ( $p < 0,001$ ) Between MG and RG, the femur weight ( $p < 0,001$ ) and tibia weight ( $p = 0,005$ ) was bigger in RG. The number of proliferative chondrocytes was lower in MG ( $5,71 \pm 0,83$ ) compared with NG ( $9,98 \pm 1,06$ ) ( $p < 0,001$ ) and RG ( $8,22 \pm 2,00$ ) ( $p = 0,032$ ). There was no difference these cells between NG and RG ( $p = 0,222$ ). The number of hypertrophic chondrocytes was lower in MD ( $1,65 \pm 0,84$ ) compared with NG ( $4,18 \pm 0,37$ ) ( $p < 0,001$ ) and RG ( $3,25 \pm 0,93$ ) ( $p = 0,021$ ), but between NG and GR there was no difference ( $p = 0,069$ ). The normoproteic diet replacement of imposed during of accelerated bone growth minimized the effects of malnutrition on the somatic growth and on bone tissue. Moreover, it promoted growth of a full recovery with the number of chondrocytes.

**Keywords:** protein malnutrition, somatic growth, epiphyseal plate, bone growth.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Aferição do peso do animal
- Figura 2** Procedimento de anestesia do animal
- Figura 3** Incisão da pata posterior direita.
- Figura 4** Coleta e dissecação do fêmur e da tíbia
- Figura 5** Obtenção do peso do osso.
- Figura 6** Paquímetro utilizado para mensuração do comprimento ósseo do fêmur e da tíbia.
- Figura 7** Ilustração da contagem do número de condrócitos no programa MESURIM.

## **LISTA DE SIGLAS**

GN: Grupo Nutrido.

GD: Grupo Desnutrido.

GR: Grupo Reposição

GH: Hormônio do Crescimento.

IGF-1: Fator de crescimento insulina símile tipo 1.

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco.

COBEA: Comitê Brasileiro de Experimentação Animal.

M $\pm$ DP: Média  $\pm$  Desvio Padrão.

## SUMÁRIO

<b>1. APRESENTAÇÃO</b>	11
<b>2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b>	12
<b>3. OBJETIVOS</b>	15
3.1. Geral	15
3.2. Geral Específicos	15
<b>4. REVISÃO DA LITERATURA</b>	16
Artigo de Revisão	17
<b>5. METODOLOGIA</b>	33
5.1. Animais	34
5.2. Grupos de Estudo	34
5.3. Evolução ponderal	35
5.4. Coleta do material	36
5.5. Processamento histológico do material	39
5.6. Análise Estatística	40
<b>6. RESULTADOS</b>	41
Artigo Original	42
<b>7. CONCLUSOES</b>	60
<b>8. PESPECTIVAS</b>	61
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	62
<b>ANEXOS</b>	65
Carta de aceitação do trabalho para apresentação na FeSBE	66
Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal	67
Comprovante de submissão do artigo à Revista Brasileira de Reumatologia	68

## 1. APRESENTAÇÃO

O presente trabalho de dissertação trata-se de um estudo experimental desenvolvido no Departamento de Anatomia da UFPE e encontra-se estruturado nos seguintes capítulos:

1. Considerações Iniciais

2. Objetivos do trabalho

3. Revisão da literatura: apresentada no formato de um **artigo de revisão sistemática** intitulado: **“Como a desnutrição protéica ou a privação alimentar podem interferir no crescimento da placa epifisária de animais?”** que avalia os trabalhos sobre as alterações na placa de crescimento de animais jovens decorrentes da desnutrição protéica ou por privação alimentar. Foi submetido à Revista Brasileira de Reumatologia e redigido segundo as normas de elaboração da referida revista.

4. Metodologia: capítulo onde estão descritos os materiais e métodos necessários à execução do presente trabalho.

5. Resultados: o capítulo de resultados está estruturado sob a forma de um artigo original intitulado: **“Efeitos da reposição nutricional sobre o crescimento somático e ósseo de ratos desnutridos precocemente”** e descreve os resultados do estudo experimental desenvolvido durante o mestrado, cujo objetivo foi avaliar os efeitos da oferta de uma dieta normoprotéica imposta na fase de aceleração do crescimento, após a desnutrição no período lactacional, sobre o crescimento somático, a placa epifisária e o crescimento ósseo. Está sendo traduzido e será enviado para a publicação na Revista Clinical Nutrition Edinburgh.

6. Conclusões

7. Perspectivas

8. Referências

## 2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O crescimento ósseo longitudinal nos mamíferos ocorre na placa epifisária (NILSSON *et al.*, 2005; TAKANO *et al.*, 2008) que representa uma faixa fina de cartilagem localizada perto das extremidades dos ossos longos (ABAD *et al.*, 1999), constituída de matriz extracelular e de um tipo de célula, os condrócitos, que, dependendo do seu grau de diferenciação (KEMBER, 1971; BALLOCK; O'KEEFE, 2003; FARNUM *et al.*, 2003), encontram-se distribuídos em três camadas ou zonas principais: a zona de repouso, a zona proliferativa e a zona hipertrófica (ABAD *et al.*, 2002; NILSSON *et al.*, 2005): Os condrócitos da zona de repouso localizam-se próximo da epífise, estão dispostos de maneira desorganizada (ABAD *et al.*, 1999; DE LUCA, 2006) e replicam numa pequena taxa. Na zona proliferativa, os condrócitos replicam numa taxa elevada (KEMBER, 1971, ROACH *et al.*, 2003) e as células filhas resultantes formam filas que se arranjam formando colunas paralelas no sentido longitudinal do osso (ABAD *et al.*, 1999; KOBAYASHI *et al.*, 2008). Num dado momento, os condrócitos submetem-se à diferenciação terminal, tornando-se volumosos, o que caracteriza a zona hipertrófica (DE LUCA, 2006), localizada adjacente à metáfise (ABAD *et al.*, 1999; DE LUCA, 2006). A cartilagem mineraliza-se e os condrócitos hipertróficos sofrem, finalmente, apoptose (KRONENBERG, 2003; DE LUCA, 2006). A zona hipertrófica é então invadida por capilares sanguíneos e por precursores de células ósseas (ABAD *et al.*, 1999; NILSSON *et al.*, 2005; DE LUCA, 2006; HARTMANN, 2007) que remodelam a cartilagem recém formada em tecido ósseo (NILSSON *et al.*, 2005; DE LUCA, 2006).

Em humanos, durante o primeiro ano da vida, o crescimento longitudinal ocorre em taxas elevadas, seguido por uma década de crescimento longitudinal modesto (VAN DER EERDEN; KARPERIEN; WIT, 2003). Essa desaceleração reflete uma capacidade finita na taxa de proliferação dos condrócitos (ROACH *et al.*, 2003; NILSSON; BARON, 2004). No fim da puberdade, ocorre fusão das placas de crescimento, cessando, desse modo, o crescimento linear (VAN DER EERDEN; KARPERIEN; WIT, 2003; PRENTICE *et al.*, 2006). Porém, em ratos, apesar da cessação do crescimento longitudinal com a idade, a placa de crescimento persiste por toda a vida do animal, embora não seja tão funcional (ROACH *et al.*, 2003).

A regulação de todas as etapas que ocorrem na placa epifisária acontece de forma ordenada e rigorosa (WALLIS, 1996; BALLOCK; O'KEEFE, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2008), através da integração de sinais produzidos por hormônios sistêmicos e locais (BALLOCK; O'KEEFE, 2003) como GH, IGF-1 (CRUICKSHANK *et al.*, 2005; DE LUCA, 2006), glicocorticóide (BARON *et al.*, 1994), estrógeno, (WEISE *et al.*, 2001; VAN DER EERDEN; KARPERIEN; WIT, 2003; NILSSON *et al.*, 2005; TAKANO *et al.*, 2008), fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento vascular endotelial (VAN DER EERDEN; KARPERIEN; WIT, 2003), leptina (GAT-YABLONSKI *et al.*, 2004), hormônios da tireóide, andrógeno, e vitamina D. A maioria destes sinais regula a função da placa de crescimento agindo localmente sobre os condrócitos da placa e também indiretamente modulando outros sinais da rede endócrina (NILSSON *et al.*, 2005).

Além desses, o crescimento e a saúde do tecido ósseo também sofrem influência dos fatores genéticos e ambientais (PRENTICE *et al.*, 2003). Dessa forma, o estado nutricional é um fator ambiental que influencia a maturação da placa epifisária (HEINRICHS *et al.*, 1997; FARNUM *et al.*, 2003; EVEN-ZOHAR *et al.*, 2008). Assim sendo, a desnutrição protéica (EVEN-ZOHAR *et al.*, 2008) ou mesmo um período curto de jejum (HEINRICHS *et al.*, 1997; FARNUM *et al.*, 2003), em animais jovens, ocasiona danos sobre a estrutura da placa epifisária comprometendo o crescimento ósseo longitudinal (HEINRICHS *et al.*, 1997; FARNUM *et al.*, 2003; MORAES, 2006; EVEN-ZOHAR *et al.*, 2008). Entretanto, caso o fator de retardo de crescimento seja retirado ainda em fases críticas de desenvolvimento, um período de crescimento de recuperação poderá ocorrer (MOSIER, 1971; EVEN-ZOHAR *et al.*, 2008), a fim de se manter uma determinada faixa de crescimento (BOERSMA; WIT, 1997). No rato, a fase de aceleração de crescimento ósseo corresponde ao período de 21 a 35 dias de vida, no qual ocorrem elevadas taxas de crescimento ósseo longitudinal (HUNZIKER; SCHENK, 1989; HUNZIKER; KAPFINGER; SAAGER, 1999) que são refletidas em mudanças na morfologia na placa epifisária (HUNZIKER; SCHENK, 1989, ROACH *et al.*, 2003).

Embora existam diversos estudos que descrevem os efeitos da manipulação nutricional na fase de lactação, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem se a oferta de uma dieta adequada na fase de aceleração de crescimento seria

capaz de alterar os efeitos deletérios da desnutrição imposta no período lactacional sobre o crescimento somático, a placa epifisária e o crescimento ósseo.

Para testar a hipótese de que a reposição de uma dieta normoprotéica imposta ainda na fase de crescimento ósseo acelerado induz um crescimento de recuperação alterando, assim, os efeitos deletérios da desnutrição no período lactacional sobre o crescimento somático e ósseo, a desnutrição foi promovida pela oferta de uma dieta hipoprotéica (caseína a 8%) durante o período de aleitamento (até 21º dia de vida), seguida da reposição de uma dieta normoprotéica por meio da dieta caseína 17% a partir do desmame até o 35º dia de vida, sendo a desnutrição dos filhotes, durante o aleitamento, ocorrida por meio da desnutrição de suas nutrizes. Para acompanhar o crescimento, os animais foram pesados diariamente até o 35º dia de vida. Por fim, foi avaliado o crescimento ósseo do fêmur e da tíbia e realizada a análise histológica da placa epifisária do fêmur.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar se a oferta de uma dieta normoprotéica imposta ainda na fase de crescimento ósseo acelerado alteraria os efeitos que a desnutrição protéica acarreta sobre o crescimento somático e ósseo e na morfologia da placa epifisária de ratos jovens desnutridos a partir do período de aleitamento.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- 1- Avaliar a evolução ponderal do animal, por meio da aferição do peso corporal;
- 2- Avaliar o crescimento ósseo longitudinal do fêmur e da tíbia, através da aferição do peso e comprimento dos ossos;
- 3- Avaliar a atividade celular dos condrócitos das zonas proliferativa e hipertrófica da placa epifisária do fêmur, através da contagem do número de condrócitos.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

Artigo submetido à Revista Brasileira de Reumatologia.

## ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA

### COMO A DESNUTRIÇÃO PROTÉICA OU A PRIVAÇÃO ALIMENTAR PODEM INTERFERIR NO CRESCIMENTO DA PLACA EPIFISÁRIA DE ANIMAIS? <sup>1</sup>

### HOW THE PROTEIN MALNUTRITION OR THE DEPRIVATION OF FOOD CAN INTERFERE WITH GROWTH OF EPIPHYSEAL PLATE OF ANIMALS?<sup>1</sup>

Karina de Carvalho da Silva<sup>2\*</sup>; Camilla Rodrigues de Souza Silva<sup>3</sup>; Rita de Cássia da Silva Costa<sup>3</sup>; Sílvia Regina Arruda de Moraes<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Trabalho desenvolvido nos Departamentos de Anatomia e de Pós-Graduação em Patologia/UFPE.

<sup>2</sup> Fisioterapeuta; Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Patologia – UFPE

<sup>3</sup> Graduanda do curso de Fisioterapia – UFPE

<sup>4</sup> Professora Adjunto do Departamento de Anatomia – UFPE

\*Correspondência para o autor: Rua das Gardêneas, 123 IIª etapa Rio Doce, Olinda, PE, Brasil, 53150570

Endereço eletrônico: [karinnacs@yahoo.com.br](mailto:karinnacs@yahoo.com.br)

#### RESUMO

**Objetivo:** Realizar uma revisão sistemática sobre as alterações ocasionadas na placa de crescimento de animais em decorrência da desnutrição protéica e/ou a privação alimentar precoce. **Métodos:** A busca foi realizada nas bases de dados PubMed/MEDLINE, LILACS, SciELO, Biblioteca Cochrane e Biblioteca Digital de Teses e Dissertações sem restrições de língua ou limite de ano. **Resultados:** Foram identificados inicialmente 140 artigos que, após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão restaram apenas 5. Em três estudos o estresse nutricional foi devido à desnutrição protéica, outro devido ao jejum e no terceiro foi por restrição alimentar. Todos os estudos apresentavam algumas omissões metodológicas. Os estudos inclusos nessa revisão demonstraram concordância quanto aos resultados obtidos, independentemente dos animais terem sido submetidos à desnutrição protéica, ao jejum ou à restrição alimentar. Os achados encontrados foram redução na altura da placa epifisária, no número de condrócitos proliferativos e hipertróficos, na taxa de crescimento ósseo e no comprimento ósseo longitudinal nos animais submetidos ao estresse nutricional. **Conclusão:** Nessa revisão sistemática foi possível observar a susceptibilidade da placa epifisária, em primeiro lugar, e dos ossos longos, de forma secundária, aos efeitos do estresse nutricional por meio da desnutrição protéica ou da privação alimentar aplicada em animais jovens.

**Palavras-chave:** placa epifisária, crescimento ósseo, desnutrição protéica, privação alimentar.

### **Abstract**

**Objective:** To perform a systematic review about the changes caused in the growth plate of animals due to protein malnutrition and/or early food deprivation. **Methods:** The research was conducted in databases PubMed/MEDLINE, LILACS, SciELO, Cochrane Library and Digital Library of Theses and Dissertations without restrictions on language or year limit. **Results:** Of the 140 articles identified only 5 last, after application of the criteria for inclusion and exclusion. In three case, the nutritional stress was due to protein malnutrition, in other due to fasting and the third was by food restriction. All studies had some methodological omissions. The cases included in this review showed agreement on the results, regardless of the animals having been subjected to protein malnutrition, the fasting or food restriction. The findings were: reduction at the epiphyseal plate, the number of proliferative and hypertrophic chondrocytes, the rate of bone growth and bone longitudinal length in animals subjected to nutritional stress. **Conclusion:** In this systematic review it was possible to observe, first, the susceptibility of the epiphyseal plate, and in a secondary way, of the long bones, to the effects of nutritional stress by protein malnutrition or deprivation of food applied in young animals. **Keywords:** epiphyseal plate, bone growth, protein malnutrition, deprivation of food.

## **INTRODUÇÃO**

Diversos estudos têm tentado explicar os possíveis distúrbios que podem levar à insuficiência ou falha do crescimento ósseo <sup>(1,2)</sup>. De uma forma geral, a marca das desordens secundária de crescimento resulta de um defeito que não se iniciou primariamente no tecido ósseo <sup>(3)</sup> como, por exemplo: as desordens endócrinas, os distúrbios específicos de sistemas orgânicos <sup>(3)</sup> e a desnutrição <sup>(3,4)</sup>. Com relação ao estado nutricional, uma alimentação inadequada nas primeiras fases da vida pode conduzir o indivíduo à desnutrição <sup>(5-7)</sup> que conduzem a alterações fisiopatológicas traduzidas inicialmente em prejuízo funcional e, posteriormente, em danos bioquímicos e físicos <sup>(8,9)</sup> como perda de peso <sup>(9-11)</sup> e inibição do crescimento longitudinal do osso <sup>(1)</sup>.

A falha no crescimento ósseo longitudinal deve-se principalmente à baixa taxa de crescimento ósseo que, por sua vez, depende essencialmente da taxa de condrogênese<sup>(4)</sup> bem como da atividade coordenada dos condrócitos dentro da placa de crescimento e, conseqüentemente, a taxa em que esse processo ocorre irá refletir alterações na síntese e desenvolvimento dos condrócitos<sup>(12)</sup>.

Como estrutura especializada com a função exclusiva de prover o crescimento ósseo longitudinal, a placa epifisária é sensível às alterações fisiológicas, bioquímicas e patológicas que ocorrem no organismo como um todo<sup>(13)</sup>. Assim sendo, a desnutrição protéica<sup>(14)</sup> ou mesmo um período curto de jejum<sup>(1,2)</sup> acarreta efeitos deletérios sobre a morfologia da placa de crescimento<sup>(1,2,14)</sup> representados por redução na altura total da placa e no número de condrócitos<sup>(1,2)</sup>, presença de colunas condrocitárias curtas com tendência à desorganização nas extremidades, alteração na forma e no tamanho dos condrócitos, formação de ninho de condrócitos e áreas de lesões na matriz<sup>(14)</sup>. Isso significa que o crescimento da placa epifisária responde a qualquer período grave de estresse nutritivo<sup>(1,2,14)</sup>. Dessa forma, ressalta-se o efeito significativo que o estado nutricional exerce sobre o desenvolvimento<sup>(5,15)</sup> e sobre as taxas de crescimento ósseo<sup>(1,2,5,8,16)</sup>.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão da literatura das repercussões da desnutrição protéica e/ou a privação alimentar precoce sobre a formação da placa de crescimento em animais jovens.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para realização desta revisão foram selecionados, sem restrições da língua, no período de maio a junho de 2009, artigos publicados a partir de periódicos indexados na base de dados LILACS, SciELO, PubMed / MEDLINE, Biblioteca Cochrane e Biblioteca Digital de Teses e Dissertações publicados durante o período de 1967 a 2008.

As palavras-chave utilizadas foram baseadas na lista do MeSH, e os seguintes termos foram escolhidos: growth plate, malnutrition, fasting. Foram também escolhidas palavras-chaves sobre o tema, para realização da busca: long-bone growth e nutrition-induced. Pela lista do Decs os termos selecionados foram: lâmina de crescimento, combinadas com os termos desnutrição, jejum.

Todas essas combinações foram utilizadas para todos os bancos de dados. As referências dos artigos selecionados também foram verificadas para identificar outros estudos que pudessem ter sido omitidos na busca eletrônica.

Título e resumos identificados através de pesquisas foram examinados independentemente por três revisores (KCS, CRSS, RCSC) na tela do computador para selecionar os estudos potencialmente relevantes. Casos de discordâncias, quando presente, foram solucionados por um quarto avaliador (SRAM).

Para seleção do estudo os seguintes critérios de inclusão foram considerados: estudos com animais, submetidos à desnutrição protéica ou privação alimentar e estudos que utilizassem como forma de avaliação do desenvolvimento da placa de crescimento parâmetros morfológicos e/ou morfométricos, estudos do crescimento ósseo longitudinal e estudos que incluíssem grupos controle e experimental.

Estudos em que o estresse nutricional foi devido à deficiência de outros nutrientes que não a desnutrição protéica, jejum ou restrição alimentar, artigos em que os animais analisados não foram submetidos ao estresse nutricional precocemente (período crítico de desenvolvimento) e estudos em que o estado nutricional estava relacionado a outros tipos de intervenções foram excluídos. Foram consideradas como desfecho primário as alterações na placa de crescimento e como desfecho secundário o comprimento ósseo longitudinal.

## RESULTADOS

Dentre os 140 artigos inicialmente identificados através da busca eletrônica, 5 preencheram os critérios de inclusão e foram incluídos na Revisão Sistemática: Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup>; Nakamoto e Miller (1979)<sup>(17)</sup>; Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup>; Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> e Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup>, (Figura 1).

O estudo de Nakamoto e Miller (1979)<sup>(17)</sup> teve por objetivo avaliar se a desnutrição protéica afetaria a atividade da fosfatase alcalina e ácida e conseqüentemente se tais alterações bioquímicas acarretariam alterações nos ossos longos de ratos. Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup> avaliaram os mecanismos responsáveis pela supressão da função da placa de crescimento em coelhos submetidos ao jejum. Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup> estudaram os mecanismos que regem o crescimento de recuperação na placa epifisária durante a restrição alimentar e imediatamente após a reposição nutricional. Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> verificaram os efeitos da deficiência protéica e/ou energética no crescimento dos ossos longos e Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup> tiveram como objetivo esclarecer se a desnutrição afeta o crescimento ósseo através da redução na função da tireóide.

Para avaliação desses parâmetros, Nakamoto e Miller (1979)<sup>(17)</sup> utilizaram respectivamente 16 ratos distribuídos aleatoriamente em grupo controle e grupo desnutrido. Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup> utilizaram 12 ratos machos *wistar* distribuídos aleatoriamente em grupo controle e desnutrido cada um dos quais subdivididos em grupo salina e tiroxina. Os outros três estudos não especificam se foi feita uma randomização da amostra. Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup> utilizaram 16 coelhos *New Zealand* com idade de 5 semanas, separados em grupo controle (livre acesso à ração) e grupo jejum (jejum de 48h), cada grupo com 8 animais. Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup> utilizaram ratos *Sprague Dawley* para compor os 3 grupos: *ad libitum*, restrição alimentar e *catch-up*. Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> utilizaram 84 ratos machos *Wistar* pesando 100g separados nos grupos: proteína e energia normais; baixa energia; baixa proteína e baixa energia e proteína. Apenas os estudos de Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup> e de Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup> descrevem as condições de manutenção dos animais: ciclo de luz/escuridão de 12/12h no estudo de Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup> e animais mantidos em condições constante de temperatura (21-24°C) com 14h de luz e 10h de escuridão no estudo de Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup>, (Tabela 1).

O estresse nutricional nos estudos de Nakamoto e Miller (1979)<sup>(17)</sup>, Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> e Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup> foi promovido pela desnutrição protéica através da oferta de ração contendo 6% de proteína. Enquanto que Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup> e Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup> submeteram os animais à privação alimentar: Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup> através de jejum de 48h e Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup> por meio de restrição alimentar de 40% baseada em estudo anterior no qual os animais foram mantidos individualmente e o consumo diário de ração por animal foi aferido, (Tabela 1).

A idade em que o estresse nutricional foi aplicado no estudo de Nakamoto e Miller (1979)<sup>(17)</sup> foi do nascimento até as idades de 10, 15 ou 20 dias de vida. Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup> aplicaram o jejum em coelhos com 5 semanas de idade. No estudo de Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup> a restrição alimentar iniciou-se aos 24 dias de vida com duração de 10 dias. Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup> aplicaram a desnutrição do nascimento até a idade de 15 dias. Já o estudo de Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> não menciona a idade de indução da desnutrição, apenas diz que foram utilizados ratos pesando 100g e que a desnutrição durou 15, 30 ou 45 dias de experimento, (Tabela 1).

Dentre os estudos selecionados quatro usaram como parâmetro de avaliação o comprimento ósseo longitudinal. Nakamoto e Miller (1979)<sup>(17)</sup> mensuraram o comprimento do fêmur com o auxílio de um paquímetro desde a fôvea da cabeça do fêmur até o côndilo medial. Os estudos de Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup>, Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> e o de Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup> não descrevem o material utilizado para a mensuração do comprimento ósseo nem o referencial anatômico aplicado.

A histologia da placa epifisária foi avaliada nos estudos de Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup>, Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup>, Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> e o de Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup>. No estudo de Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup>, a determinação na taxa de crescimento foi avaliada através da introdução de pinos de metal introduzidos percutaneamente na metáfise da tíbia para posteriormente serem submetidos à radiografia, antes da aplicação do jejum. As radiografias foram examinadas por meio de um microscópio de dissecação e um micrômetro. O examinador foi mascarado quanto à manipulação nutricional. Após 48h do experimento os animais foram sacrificados. Cortes histológicos de 6µm da placa epifisária proximal da tíbia foram corados com Tricômio de Masson. No estudo de Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup> ambas as placas da tíbia foram isoladas e armazenadas a -20° C. Para a análise histológica, foram realizados

cortes de 5µm de espessura corados com Hematoxilina-Eosina e Azul de Alcian. A análise morfométrica foi realizada com o software Olympus DP-soft, Olympus Optical Co.). A mensuração da espessura da placa epifisária representou uma média de 6 medições em dois cortes histológicos por animal. A contagem do número de condrócitos proliferativo e hipertrófico deu-se em 4 colunas por animal, em dois cortes histológicos. No estudo de Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> e de Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup> os fêmures foram fixados com formalina a 10% e descalcificados com ácido fórmico a 10%. Secções da placa de crescimento distal do fêmur foram coradas com Hematoxilina-Eosina para a mensuração da espessura da placa de crescimento. Além disso, o estudo de Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup> também realizou a contagem do número de condrócitos das zonas proliferativa e hipertrófica em uma coluna no centro da placa.

Com relação ao comprimento ósseo longitudinal verificou-se que a desnutrição protéica ou a restrição alimentar ocasionaram efeitos deletérios sobre o tecido ósseo, evidenciado pelo menor comprimento ósseo nos animais submetidos ao estresse nutricional nos estudos de Nakamoto e Miller (1979)<sup>(17)</sup>, Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup>, Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> e Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup>.

A análise histológica da placa epifisária demonstrou no estudo de Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup> redução no número de condrócitos por coluna nas zonas proliferativa e hipertrófica, diminuição na altura total da placa e na altura dos condrócitos hipertróficos terminais nos animais submetidos ao jejum, além disso, a taxa de crescimento da tíbia foi menor nos animais submetidos ao jejum, do que o grupo nutrido. No estudo de Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup> a espessura da placa epifisária se manteve constante para o grupo *ad libitum*, mas foi significativamente reduzida no grupo restrição. O grupo restrição apresentou redução no número de condrócitos. No estudo de Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> a desnutrição ocasionou menor espessura da placa epifisária e Kanagawa *et*

*al.* (1987)<sup>(20)</sup> encontraram redução na espessura da placa de crescimento e no número de condrócitos hipertróficos nos animais desnutridos do que nos animais nutridos, porém, a desnutrição não alterou o número de condróctios proliferativos. Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup> concluíram que em coelho, o jejum causa uma rápida diminuição dos condrócitos da placa de crescimento.

## DISCUSSÃO

Foram observadas algumas falhas metodológicas nos estudos inclusos. Heinrichs *et al.* (1997)<sup>(1)</sup>, Nakamoto e Miller (1979)<sup>(17)</sup> e Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> não relatam as condições ambientais onde os animais foram mantidos. Esse é um fator de interferência importante, visto que condições desfavoráveis do ambiente tornam-se fator de estresse que pode influenciar o comportamento e o consumo alimentar dos animais, alterando significativamente os resultados. Os estudos de Even-Zohar *et al.* (2008)<sup>(18)</sup>, Kuramitsu *et al.* (1985)<sup>(19)</sup> e o de Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup> não descrevem o material utilizado para a mensuração óssea, nem tampouco o referencial anatômico utilizado, dado este que pode dificultar a comparação dos seus resultados com outros trabalhos, além de não ser possível a reprodução metodológica desse parâmetro do seu estudo. Em apenas dois estudos<sup>(17,20)</sup> foram descritas escolha randômica dos grupos, baseada em outro estudo. Todos os estudos utilizaram grupos controle, o que leva a pressupor que sejam estudos randômicos controlados. No estudo de Kanagawa *et al.* (1987)<sup>(20)</sup> usamos como forma de comparação apenas os subgrupos salina (controle) dos grupos nutrido e desnutrido.

A desnutrição ou a privação alimentar empregada nos estudos inclusos nessa revisão ocorreu no período pós-natal, período crítico de desenvolvimento dos ossos

longos <sup>(17)</sup> que se caracteriza por ser uma fase fundamental para a aquisição de massa óssea <sup>(21)</sup> e na qual um déficit nutricional pode comprometer permanentemente a estrutura do esqueleto <sup>(15)</sup>. Nos estudos de Nakamoto e Miller (1979) <sup>(17)</sup> e de Kanagawa *et al.* (1987) <sup>(20)</sup> a desnutrição foi aplicada no período de aleitamento. Heinrichs *et al.* (1997) <sup>(1)</sup> e Even-Zohar *et al.* (2008) <sup>(18)</sup> no período pós-desmame. Porém, o estudo de Kuramitsu *et al.* (1985) <sup>(19)</sup> não especifica a idade de indução da desnutrição.

Os resultados dos efeitos do estresse nutricional sobre o comprimento dos ossos longos encontrados nos estudos de Nakamoto e Miller (1979) <sup>(17)</sup>, Even-Zohar *et al.* (2008) <sup>(18)</sup>, Kuramitsu *et al.* (1985) <sup>(19)</sup> e de Kanagawa *et al.* (1987) <sup>(20)</sup> são concordantes e demonstram que a desnutrição protéica <sup>(17,19,20)</sup> e a restrição alimentar <sup>(18)</sup> acarretam menor comprimento ósseo longitudinal nos animais submetidos ao estresse nutricional. Segundo Nakamoto e Miller (1979) <sup>(17)</sup> a desnutrição protéica afeta as dimensões lineares dos ossos longos com os processos de formação e calcificação do tecido ósseo prejudicados. Segundo Kuramitsu *et al.* (1985) <sup>(19)</sup>, possivelmente as alterações encontradas se devam a um distúrbio na secreção dos hormônios que estimulam o crescimento. Esses resultados sugerem que a deficiência protéica diminui a proliferação das células da placa de crescimento, que induz um lento crescimento longitudinal dos ossos longos.

Da mesma forma, a análise histológica da placa epifisária nos estudos de Heinrichs *et al.* (1997) <sup>(1)</sup>, Even-Zohar *et al.* (2008) <sup>(18)</sup>, Kuramitsu *et al.* (1985) <sup>(19)</sup> e Kanagawa *et al.* (1987) <sup>(20)</sup> demonstrou semelhança nos achados encontrados: redução na altura da placa epifisária <sup>(1,18-20)</sup> e no número de condrócitos proliferativos <sup>(1,18)</sup> e hipertróficos <sup>(1,18,20)</sup> em decorrência da desnutrição protéica <sup>(19,20)</sup>, do jejum <sup>(1)</sup> ou da restrição alimentar <sup>(18)</sup>. Porém, Kanagawa *et al.* (1987) <sup>(20)</sup> não encontraram diferença no

número de condrócitos proliferativos entre os animais dos grupos nutrido e desnutrido. A escolha do tipo de condrócitos para a avaliação histológica da placa epifisária e sua relação com o crescimento ósseo é condizente com a literatura que demonstra ser a atividade dos condrócitos proliferativos <sup>(22)</sup> e hipertróficos <sup>(12,22)</sup> a que mais regula o crescimento ósseo longitudinal.

## **CONCLUSÃO**

Demonstrou-se com esta revisão sistemática que são poucos os estudos que avaliem os efeitos do estresse nutricional por meio da desnutrição protéica ou da privação alimentar aplicada em animais jovens sobre o crescimento ósseo longitudinal. Os estudos inclusos nessa revisão demonstraram concordância quanto aos resultados obtidos, embora não tenham apresentado uma padronização do modelo utilizado para realizar o estresse nutricional (desnutrição protéica, jejum ou restrição alimentar) e do período escolhido para avaliação do tecido ósseo submetido a esse estresse. Com relação ao aspecto metodológico dos trabalhos observa-se também uma deficiência em relação aos critérios adotados para a obtenção da amostra (cálculo amostral e randomização).

Apesar das diferentes metodologias utilizadas para esse tipo de avaliação, a análise dos estudos incluídos nessa revisão sistemática demonstra haver uma susceptibilidade da placa epifisária, primeiramente, e dos ossos longos, secundariamente, aos efeitos do estresse nutricional ocasionado pela desnutrição protéica ou privação alimentar quando aplicadas durante o período pós-natal.

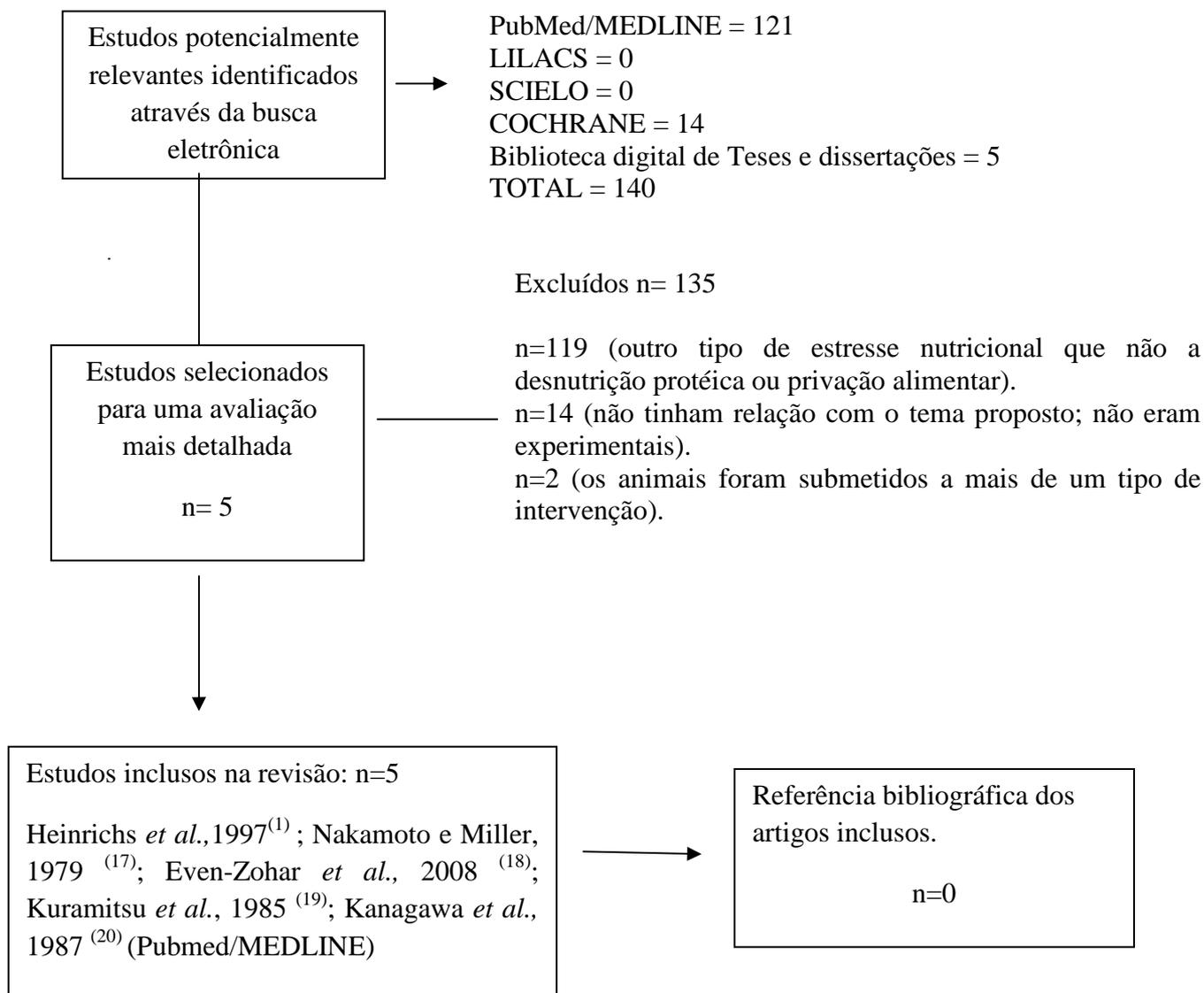
Demonstra-se, assim, a necessidade de estudos que avaliem os efeitos da desnutrição protéica ou da privação alimentar no desenvolvimento e/ou crescimento da

placa epifisária durante o período crítico de desenvolvimento e crescimento do tecido ósseo que apliquem metodologias semelhantes e que obedecem a critérios que evitem o máximo possível eventuais viés do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- (1) Heinrichs C, Colli M, Yanovski JA, Laue L, Gerstl NA, Kramer AD *et al.* Effects of fasting on the growth plate: Systemic and local mechanisms. *Endocrinology*. 1997, 138 (12): 5359–5365.
- (2) Farnum CE, Lee AO, O'hara K, Wilsman NJ. Effect of short-term fasting on bone elongation rates: an analysis of catch-up growth in young male rats. *Pediatr Res*. 2003, 53: 33–41.
- (3) Boersma B, Wit JM. Catch-up Growth. *Endocr Rev*. 1997, 18(5): 646–661.
- (4) De Luca F. Impaired Growth Plate Chondrogenesis in children with chronic illnesses. *Pediatr Res*. 2006, 59: 625–629.
- (5) Hsueh AM, Simonson M, Chow BF, Hanson HM. The importance of the period dietary restriction of the dam on behavior and growth in the rat. *J Nutr*. 1974, 104: 37-46.
- (6) Ferreira HS, Ott AMT. Avaliação do estado nutricional de crianças menores de cinco anos do Estado de Rondônia - Brasil. *Rev Saude Publica*. 1988, 22: 179 - 83.
- (7) Guzmán C, Cabrera R, Cárdenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol*. 2006, 572 (1): 97-108.
- (8) Rol De Lama MA, Pérez-Romero A, Tresguerres JAF, Hermanussen M, Ariznavarreta C. Recombinant human growth hormone enhances tibial growth in peripubertal female rats but not in males. *Eur J Endocrinol*. 2000, 142: 517–523.
- (9) Gurmini J, Cecílio WAC, Schuler SL, Olandoski M, Noronha L. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *J Bras Patol Med Lab*. 2005, 41 (4): 271-278.
- (10) Winick M, Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages *J Nutr*. 1966, 89:300-306.
- (11) Oliveira JC, Silva APS, Barbosa FB. Avaliação da evolução ponderal e homeostasia glicídica de ratos submetidos à desnutrição protéica lactacional. *Universidade do Estado do Rio Grande do Norte Expressão*, Mossoró. 2003, 34(1-2): 53-60.

- (12) Hunziker EB, Schenk RK. Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J Physiol.* 1989, 414:55-71.
- (13) Oliveira LP, Elias N, Cordeiro DX, Teixeira JCM, Franzosi TR, Guimarães HM *et al.* Estudo histológico da placa de crescimento após a deservação periférica. *Rev Bras Ortop.* 1993, 28 (10): 763-766.
- (14) Moraes VV. Efeitos da desnutrição precocemente corrigida na morfologia da epífise de crescimento de coelhos (Nova Zelândia). 139f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- (15) Bonjour JP. Dietary protein: an essential nutrient for bone health. *J Am Coll Nutr.* 2005, 24 (6): 526S–536S.
- (16) Schultze MO. Effects of malnutrition in early life on subsequent growth and reproduction of rats. *J Nutr.* 1954, 25-33.
- (17) Nakamoto T, Miller SA. Physical and biochemical changes of the mandible and long bone in protein-energy malnourished newborn rats. *J Nutr.* 1979, 109: 1477-1482.
- (18) Even-Zohar N, Jacob J, Amariglio N, Rechavi G, Potievsky O, Phillip M *et al.* Nutrition-induced catch-up growth increases hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  RNA levels in the growth plate. *Bone.* 2008, 42: 505–515.
- (19) Kuramitsu N, Matsui T, Yano H, Kawashima R. The influence of protein and/or energy deficiency on the growth of long bone in rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1985, 31(2):189-96.
- (20) Kanagawa Y, Funaba M, Matsui T, Yano H, Kawashima R. Effect of thyroxine injection on bone growth in malnourished rats at different growth stages. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1987, 33 (1):55-62.
- (21) Pettersson U, Nordstrom P, Alfredson H, Henriksson-Larsen K, Lorentzon R. Effect of high impact activity on bone mass and size in adolescent females: a comparative study between two different types of sports. *Calcif Tissue Int.* 2000, 67: 207–214.
- (22) Roach H I, Mehta G, Oreffo ROC, Clarke NMP, Cooper C. Temporal Analysis of Rat Growth Plates: Cessation of Growth with Age Despite Presence of a Physis. *J Histochem Cytochem.* 2003, 51:373–383.



**Figura 1:** Fluxograma para busca e seleção dos artigos da Revisão Sistemática.

Tabela 1 – Descrição dos estudos incluídos e avaliação da qualidade dos artigos.

<b>Autor</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Tamanho total da amostra</b>	<b>Tipo de estresse nutricional</b>	<b>Idade do animal em que o estresse nutricional foi aplicado</b>	<b>Duração do estresse nutricional</b>	<b>Tipo de análise para obtenção dos resultados</b>	<b>Randomização</b>	<b>Mascaramento análise resultados</b>
Heinrichs et al., 1997 <sup>(1)</sup>	Coelhos machos <i>Nova Zelândia</i>	16	Jejum	5 semanas de idade	48h	Análise histológica da placa epifisária	não informaram	sim
Nakamoto, Miller, 1979 <sup>(17)</sup>	Ratos (não informaram raça nem sexo)	16	Desnutrição protéica (6%)	nascimento	10,15 e 20 dias	Mensuração do comprimento ósseo	sim	não informaram
Even-Zohar et al., 2008 <sup>(18)</sup>	Ratos machos <i>Sprague Dawley</i>	Não relatam o tamanho exato da amostra. Dizem que usaram de 5 a 6 animais por grupo	Restrição alimentar (40%)	24 dias de idade	10 dias	Análise histológica e mensuração do comprimento ósseo	não informaram	não informaram

---

Kuramitsu et al., 1985 <sup>(19)</sup>	Ratos machos <i>wistar</i>	84	Desnutrição protéica (6%)	nascimento	15 dias	Análise histológica e mensuração do comprimento ósseo	sim	não informaram
Kanagawa et al., 1987 <sup>(20)</sup>	Ratos machos <i>wistar</i>	12	Desnutrição protéica (6%)	não informaram	15, 30 e 45 dias de experimento	Análise histológica e mensuração do comprimento ósseo	não informaram	não informaram

## **5. METODOLOGIA**

## **METODOLOGIA**

### **5.1. Animais**

Os animais foram obtidos acasalando-se ratos *Wistar* machos e fêmeas adultos (provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco), na proporção de um macho para duas fêmeas durante um período de 16 dias (Committee on Laboratory Animal Diets). O diagnóstico da prenhez foi feito pela observação do crescimento do ventre. Um dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada em no máximo sete filhotes machos por mãe. Esse número parece conferir maior potencial lactotrófico (Committee on Laboratory Animal Diets).

Todos os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (no máximo 7 animais/gaiola) juntos a uma nutriz e com livre acesso à ração e à água filtrada. O ambiente foi climatizado (temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com ciclo de luz (06 às 18h) e escuridão (18 às 06h) constante. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (ofício nº 24/08-2008) (ANEXO nº 2) e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

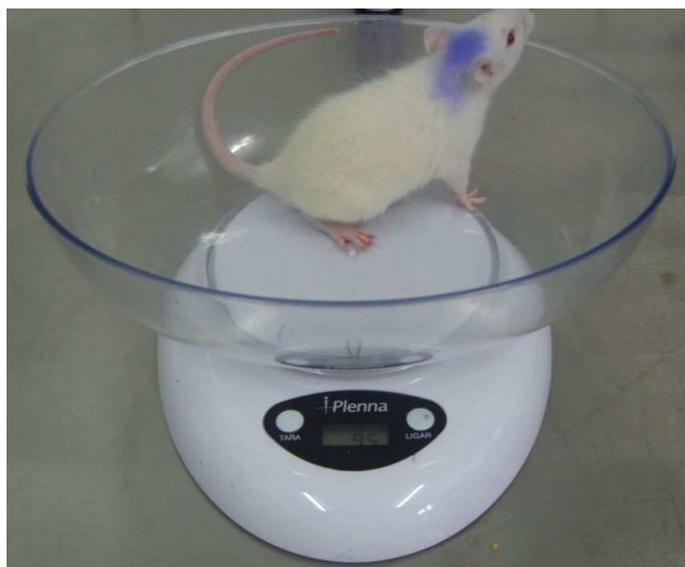
### **5.2. Grupos de estudo**

Segundo a manipulação nutricional (Tabela 1), a partir do primeiro dia de vida, a prole (30 animais, machos) foi separada aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo Nutrido (GN, n=10), composto de filhotes amamentados por nutrizes que receberam dieta normoprotéica (caseína 17%), durante o período de aleitamento e Grupo Desnutrido (GD, n=20) constituídos por filhotes amamentados por nutrizes que receberam dieta hipoprotéica (caseína 8%) no mesmo período. Após o desmame (21º dia de vida) até o 35º dia de vida, metade dos filhotes do Grupo Desnutrido (GD) passou a receber a dieta normoprotéica (caseína a 17%), constituindo o Grupo Reposição (GR), enquanto a outra metade continuou a receber a dieta hipoprotéica (caseína 8%). Os animais do Grupo Nutrido (GN) continuaram a receber dieta normoprotéica (caseína 17%) até a idade de 35 dias de vida. A perda amostral total foi de 9 animais: um animal foi sacrificado por apresentar grande perda de peso corporal com relação aos demais filhotes da mesma ninhada, sugerindo apresentar alguma outra patologia associada; outro animal, no segundo dia de vida, foi encontrado morto e os

outros 7 animais do grupo reposição (todos da mesma ninhada) foram sacrificados na véspera do sacrifício, pois apresentaram perda de peso corporal durante o período de reposição nutricional.

### 5.3. Evolução Ponderal

A avaliação do peso corporal (PC) foi realizada a partir do primeiro dia pós-parto até o 35º dia de vida dos animais, usando uma balança digital Smart (sensibilidade 1 g) (Figura1).



**Figura 1.** Demonstração do procedimento de aferição do peso dos animais.

**Tabela 1.** Composição das dietas utilizadas no experimento à base de caseína (\*).

Caseína a 8%		Caseína a 17%	
Ingredientes	Quantidade por Kg de ração	Ingredientes	Quantidade por Kg de ração
Caseína	79,30g	Caseína	179,30g
Mix de vitamina	10,00g	Mix de vitamina	10,00g
Mix de sais minerais	35,00g	Mix de sais minerais	35,00g
Celulose	50,00g	Celulose	50,00g
Óleo de soja	70ml	Óleo de soja	70ml
Bitartarato de colina	2,50 g	Bitartarato de colina	2,50 g
DL-metionina	3,00g	DL-metionina	3,00g
Amido	750,20g	Amido	650,20g

(\*) fonte: (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

#### 5.4. Coleta do material

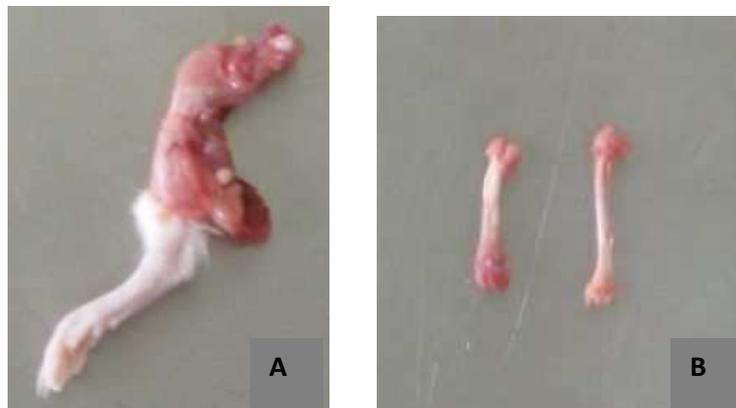
No 36º dia de vida, os animais foram anestesiados via subcutânea com xilazina (Rompum® – Bayer) (0,05ml/100g) e cloridrato de ketamina (Ketalar®) (0,25ml/100g) (Figura 2) e, em seguida, foi realizada a coleta dos ossos, através de uma incisão ventral na pata posterior direita (Figura 3) para a remoção do fêmur e da tíbia. Ambos os ossos foram dissecados (Figura 4) e pesados em uma balança digital (marca AND, modelo HR-200), sensibilidade 0,1mg (Figura 5). O comprimento dos ossos (desde a cabeça do fêmur até a superfície articular dos côndilos femurais e da epífise proximal até a epífise distal da tíbia) foi aferido com auxílio de um paquímetro (marca Western, 0,02mm) (Figura 6).



**Figura 2.** Procedimento de anestesia do animal.



**Figura 3.** Incisão da pata posterior direita.



**Figura 4.** Coleta e dissecação do fêmur e da tíbia. **A-** Desarticulação proximal da pata. **B-** Ossos dissecados.



**Figura 5.** Aferição do peso do osso.

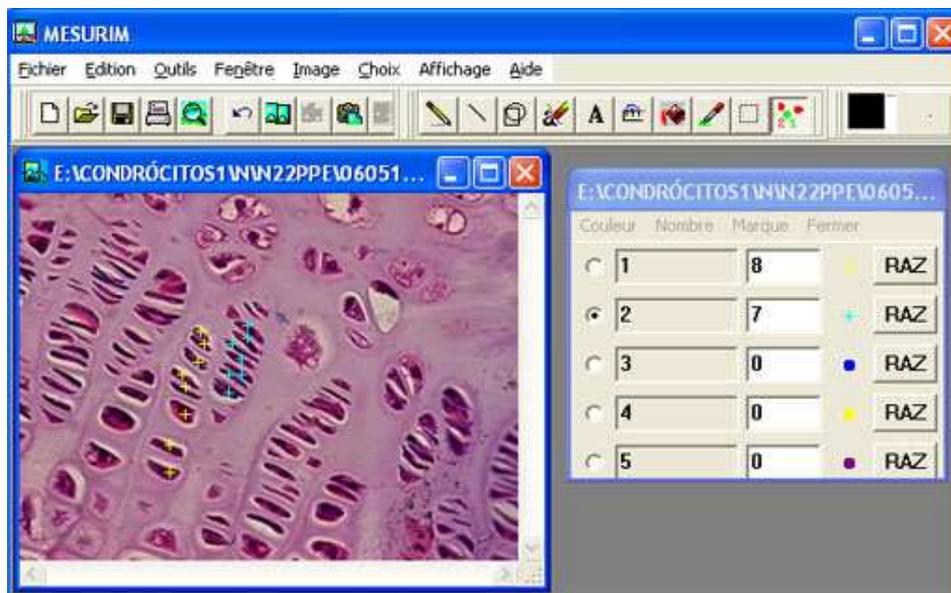


**Figura 6.** Mensuração do comprimento ósseo do fêmur e da tíbia com um paquímetro.

### **5.5. Processamento histológico do material**

Os fêmures foram fixados (formol tamponado= 10ml de formol a 37% e 27ml de tampão fosfato 0,1 M - pH = 7,0) e em seguida, descalcificados com solução de ácido nítrico a 10%, durante aproximadamente 40 minutos. Após a descalcificação, os fêmures foram seccionados transversalmente ao nível do terço médio de suas diáfises e longitudinalmente (coronal) ao nível de suas epífises proximais, processados histologicamente e incluídos em parafina. Cortes com 5 $\mu$ m de espessura foram corados com hematoxilina-eosina e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan – Merck).

A partir dos cortes coronais das epífises proximais dos fêmures (6 animais para cada grupo experimental) foi realizada a captura das imagens com uma videocâmara (Samsung SHC-410NAD) acoplada a um microscópio óptico Olympus (objetiva de 20X) e um software para captura de imagens (TV TUNER APPLICATION). Nas imagens obtidas foi realizada a contagem do número de condrócitos, nas zonas proliferativa e hipertrófica, em 20 colunas por animal, utilizando-se o programa MESURIM (Figura 7).



**Figura 7.** Ilustração da contagem do número de condrócitos no programa MESURIM.

### 5.6. Análise Estatística.

A análise estatística para a comparação dos grupos foi realizada através do programa SigmaStat 2.0. Foi utilizado o teste t- Student para as amostras paramétrica e o teste Mann-Whitney para as amostras não-paramétricas. A significância estatística foi considerada, admitindo-se um nível de 5% em todos os casos ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média e Desvio Padrão ( $M \pm DP$ ) para as amostras paramétricas e Mediana com valores mínimos e máximos, para as não paramétricas.

## **6. RESULTADOS**

## ARTIGO ORIGINAL

## EFEITOS DA REPOSIÇÃO NUTRICIONAL SOBRE O CRESCIMENTO SOMÁTICO E ÓSSEO DE RATOS DESNUTRIDOS PRECOCEMENTE

Karina de Carvalho da Silva<sup>a\*</sup>; Fabiana Soares Bizarria<sup>b</sup>; Rafael Justino da Silva<sup>b</sup>; Camilla Rodrigues de Souza Silva<sup>b</sup>; Rita de Cássia da Silva Costa<sup>b</sup>; Silvânia Tavares Paz<sup>a</sup>; Sílvia Regina Arruda de Moraes<sup>c</sup>.

<sup>a</sup> Pós-Graduação em Patologia, UFPE, Recife, PE, Brasil

<sup>b</sup> Alunos do Curso de Fisioterapia, UFPE, Recife, PE, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Anatomia, UFPE, Recife, PE, Brasil

\*Correspondência para o autor: Rua das Gardêneas, 123 IIª etapa Rio Doce Olinda, PE, Brasil, 53150-570. Tel:8656-0944

Endereço eletrônico: [karinnacs@yahoo.com.br](mailto:karinnacs@yahoo.com.br)

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da reposição nutricional na fase de crescimento ósseo acelerado. **Métodos:** 30 ratos, Grupos: Nutrido (GN), Desnutrido (GD), Reposição (GR). Desnutrição promovida pela caseína 8% e reposição pela caseína 17%. Acompanhou-se diariamente o peso corporal. Aos 36 dias de vida, os animais foram sacrificados. Analisou-se: peso e comprimento do fêmur e da tíbia; número de condrócitos proliferativos e hipertróficos. **Resultados:** peso corporal menor nos GD e GR comparados ao GN. Entre GD e GR, peso corporal maior no GR, a partir do 32º dia. Comprimento, peso do fêmur e da tíbia menores no GD e GR do que no GN. Entre GD e GR, comprimento do fêmur maior no segundo, mas o comprimento da tíbia não apresentou diferença entre os grupos. Peso do fêmur e da tíbia maiores no GR do que no GD. Número de condrócitos menor no GD comparado ao GN e GR. Não houve diferença no número dessas células entre GN e GR. Entre GD e GR, não houve diferença. **Conclusões:** a reposição nutricional minimizou os efeitos da desnutrição sob o crescimento somático e do tecido ósseo.

**Palavras-chave:** desnutrição, peso corporal, crescimento ósseo, placa epifisária.

## ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate the effects of a balanced diet replacement of imposed during of accelerated bone growth. **Methods:** 30 rats, Groups: Nourished(NG), Malnourished(MG), Replacement(RG). Malnutrition promoted by the 8% casein and casein replacement by the 17% casein. Followed up daily body weight. At 36 days of life, the animals were sacrificed. Were analyzed: of the femur and tibia weight and length; number of the proliferative and hypertrophic chondrocytes. **Results:** body weight (g) lower in MG and RG compared to NG. Between MG and RG, body weight bigger in RG, from 32 days. Length, weight of the femur and tibia lower in MG and RG than NG. Between MG and RG, femur length bigger in the second, but tibia length showed no difference between groups. The femur weight and tibia weight bigger in RG than MG. Number of chondrocytes lower in MG compared with NG and RG. There was no difference in the number these cells between NG and RG. Between MG and RG, there was no difference. **Conclusion:** the balanced diet replacement minimized the effects of malnutrition on the somatic growth and on bone tissue.

**Keywords:** malnutrition, body weight, bone growth, epiphyseal plate.

## INTRODUÇÃO

O período de lactação é considerado a fase de maior suscetibilidade aos danos provenientes da desnutrição <sup>(1,2)</sup>. Estudos demonstram que a manipulação nutricional de nutrízes durante essa fase <sup>(3-5)</sup> acarreta efeitos deletérios no crescimento corpóreo, evidenciado pelo baixo peso corporal <sup>(1,2)</sup> e prejudica a formação e a calcificação da matriz óssea, afetando o crescimento dos ossos longos <sup>(4)</sup>.

Nos mamíferos, o crescimento ósseo longitudinal ocorre na placa epifisária, uma faixa fina de cartilagem localizada perto das extremidades dos ossos longos <sup>(6)</sup>, constituída de matriz extracelular e de um tipo de célula, os condrócitos, que, dependendo do seu grau de diferenciação <sup>(7)</sup>, encontram-se distribuídos em três camadas ou zonas principais: a zona de repouso, a zona proliferativa e a zona hipertrófica <sup>(8,9)</sup>.

A placa epifisária é altamente regulada por meio da integração de sinais produzidos por hormônios sistêmicos e locais <sup>(7)</sup>, mas também sofre influência dos

fatores genéticos e ambientais <sup>(10)</sup>. Dessa forma, o estado nutricional é um fator ambiental que influencia a maturação da placa epifisária <sup>(11-13)</sup>. Assim sendo, a restrição alimentar <sup>(13)</sup> ou mesmo um período curto de jejum <sup>(11,12)</sup> ocasiona danos sobre a morfologia da placa epifisária e compromete o crescimento ósseo longitudinal <sup>(11-13)</sup>.

Se a criança atingida por nanismo nutricional continua a viver nas mesmas condições em que ela adoeceu, ela não recuperará a sua velocidade de crescimento rápido para que atinja o seu potencial genético <sup>(14)</sup>. Porém, caso o fator de retardo de crescimento seja retirado ainda em fases críticas de desenvolvimento, um período de crescimento de recuperação poderá ocorrer <sup>(13,15-18)</sup>, a fim de se manter uma determinada faixa de crescimento <sup>(17)</sup>. No rato, a fase de aceleração de crescimento ósseo corresponde ao período de 21 a 35 dias de vida, no qual ocorrem elevadas taxas de crescimento ósseo longitudinal <sup>(19,20)</sup> que são refletidas em mudanças na morfologia na placa epifisária <sup>(19,21)</sup>.

Assim sendo, embora existam estudos que descrevem os efeitos da manipulação nutricional na fase de lactação, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliem se a oferta de uma dieta normoprotéica imposta na fase de aceleração de crescimento seria capaz de alterar os efeitos deletérios da desnutrição no período lactacional sobre o crescimento somático, a placa epifisária e o crescimento ósseo. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da reposição nutricional sobre a evolução ponderal, o crescimento dos ossos longos e a atividade celular dos condrócitos proliferativos e hipertróficos na fase de aceleração de crescimento ósseo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção da prole, foram acasalados ratos *Wistar* machos e fêmeas adultos, na proporção de um macho para duas fêmeas durante um período de 16 dias. Um dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada em no máximo 7 filhotes machos por mãe. Esse número parece conferir maior potencial lactotrófico <sup>(22)</sup>. Todos os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (máximo 7 animais/ gaiola) juntos a uma nutriz e com livre acesso à ração e à água filtrada. O ambiente foi climatizado (temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com ciclo de luz (06 às 18h) e escuridão (18 às 06h) constante. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Segundo a manipulação nutricional, a partir do primeiro dia de vida, a prole (30 animais, machos) foi separada aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo Nutrido (GN, n=10), composto de filhotes amamentados por nutriz que receberam dieta normoprotéica (caseína 17%) <sup>(23)</sup>, durante o período de aleitamento e Grupo Desnutrido (GD, n=20) constituídos por filhotes amamentados por nutriz que receberam dieta hipoprotéica (caseína 8%) no mesmo período. Após o desmame (21<sup>o</sup> dia de vida) até o 35<sup>o</sup> dia de vida, metade dos filhotes do Grupo Desnutrido (GD) passou a receber a dieta normoprotéica (caseína a 17%), constituindo o Grupo Reposição (GR), enquanto a outra metade continuou a receber a dieta hipoprotéica (caseína 8%). Os animais do Grupo Nutrido (GN) continuaram a receber dieta normoprotéica (caseína 17%) até a idade de 35 dias de vida. A avaliação do peso corporal (PC) foi realizada a partir do primeiro dia pós-natal até o 35<sup>o</sup> dia de vida dos animais, usando uma balança digital Smart (sensibilidade 1 g).

No 36º dia de vida, os animais foram anestesiados via subcutânea com xilazina (Rompum® – Bayer) (0,05ml/100g) e cloridrato de ketamina (Ketalar®) (0,25ml/100g) e realizada a coleta dos ossos, através de uma incisão ventral na pata posterior direita para a remoção do fêmur e da tíbia. Ambos os ossos foram dissecados e pesados em uma balança digital (marca AND, modelo HR-200), sensibilidade 0,1mg. O comprimento dos ossos (desde a cabeça do fêmur até a superfície articular dos côndilos femurais e da epífise proximal até a epífise distal da tíbia) foi aferido com um paquímetro (marca Western, 0,02mm).

Os fêmures foram fixados (formol tamponado= 10ml de formol a 37% e 27ml de tampão fosfato 0,1 M - pH = 7,0), descalcificados com solução de ácido nítrico a 10%, durante aproximadamente 40 minutos, seccionados transversalmente ao nível do terço médio de suas diáfises e longitudinalmente (coronal) ao nível de suas epífises proximais e incluídos em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina.

A partir dos cortes coronais das epífises proximais dos fêmures (6 animais para cada grupo experimental) foi realizada a captura das imagens com uma vídeocâmera (Samsung SHC-410NAD) acoplada a um microscópio óptico Olympus (objetiva de 20X) e um software para captura de imagens (TV TUNER APPLICATION). Nas imagens obtidas foi realizada a contagem do número de condrócitos, nas zonas proliferativa e hipertrófica, em 20 colunas por animal, utilizando-se o programa MESURIM.

A análise estatística para a comparação dos grupos foi realizada através do programa SigmaStat 2.0. Foi utilizado o teste t- Student para as amostras paramétrica e o teste Mann-Whitney para as amostras não-paramétricas. A significância estatística foi

considerada, admitindo-se um nível de 5% em todos os casos ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média e Desvio Padrão ( $M \pm DP$ ) para as amostras paramétricas e, Mediana com valores mínimos e máximos, para as não paramétricas.

## **RESULTADOS**

### **Evolução ponderal**

A partir do 10º dia de vida os animais do GD apresentaram peso corporal menor que os animais do GN, ( $p < 0,05$ ). Durante todo o período de reposição nutricional, os animais do GR não conseguiram ultrapassar, ou mesmo atingir, o peso dos animais GN, ( $p < 0,05$ ), entretanto, a partir do 32º dia de vida, os animais GR apresentaram peso corporal maior do que os animais do GD ( $p < 0,05$ ), (Figura 1).

### **Comprimento dos ossos**

O GD apresentou o comprimento do fêmur e da tíbia menor do que o GN ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma, o GR apresentou o comprimento do fêmur ( $p = 0,031$ ) e da tíbia ( $p = 0,002$ ) menores do que os animais do GN. Entre o GD e GR, o comprimento do fêmur foi maior no segundo ( $p = 0,004$ ), mas o comprimento da tíbia não apresentou diferença entre os grupos ( $p = 0,074$ ) (Tabela 1).

### **Peso dos ossos**

O peso do fêmur e da tíbia apresentou valores menores nos animais do GD, quando comparados aos animais do GN ( $p < 0,001$ ). De maneira semelhante, o GR apresentou o peso do fêmur e da tíbia menor em relação ao GN ( $p < 0,001$ ). Entre os GD e GR, o peso do fêmur ( $p < 0,001$ ) e da tíbia ( $p = 0,005$ ) foi maior no GR (Tabela 1).

### **Número de condrócitos**

Os animais do GD apresentaram menor número de condrócitos proliferativos, quando comparados ao GN ( $p < 0,001$ ) e GR ( $p = 0,032$ ). Não houve diferença no número de condrócitos proliferativos entre os GN e GR ( $p = 0,222$ ). Da mesma forma, o GD apresentou menor número de condrócitos hipertróficos, quando comparados ao GN ( $p < 0,001$ ) e GR ( $p = 0,021$ ). Não houve diferença no número de condrócitos hipertróficos entre os GN e GR ( $p = 0,069$ ) (Tabela 2).

### **DISCUSSÃO**

No presente estudo, a oferta de uma dieta hipoprotéica a nutrízes, durante o período de lactação, ocasionou menor peso corporal em sua prole, observado a partir do 10º dia, quando comparado ao grupo controle. Relatos da literatura também encontraram menor peso corporal em animais desnutridos nessa fase <sup>(1,2,24)</sup>. Assim sendo, sugere-se que o leite, nestas condições, esteja modificado em sua qualidade ou quantidade <sup>(2,24)</sup>. Caso tal deficiência nutricional se torne crônica, será seguida pela parada no crescimento <sup>(25)</sup>. Porém, em alguns casos, é possível ocorrer um “crescimento de recuperação” ou “*catch-up growth*”, quando o fator de retardo de crescimento é retirado <sup>(13,17)</sup>.

Nesse estudo, entretanto, mesmo após a retirada do fator de retardo de crescimento por meio da reposição de uma dieta normoprotéica, os animais previamente desnutridos não conseguiram atingir o peso corporal apresentado pelos animais nutridos, corroborando com os achados de Gostein, Bond (1979) <sup>(26)</sup>, nos quais mesmo

após a reposição nutricional os animais desnutridos persistiram com menor peso corporal até 42 dias de vida, quando comparados aos animais nutridos.

Por outro lado, a oferta de uma dieta normoprotéica a partir do período pós-desmame, parece ter minimizado os efeitos da desnutrição e ocasionado um crescimento de recuperação, embora incompleto, uma vez que o grupo reposição, a partir do 32º dia de vida, apresentou maior peso corporal quando comparado ao grupo desnutrido. É provável que, se o período de reposição se prolongasse, poderia ser possível observar um crescimento de recuperação completo também em relação ao grupo controle.

Em se tratando do tecido ósseo, a desnutrição protéica nesse período, acompanhada ou não de reposição de uma dieta normoprotéica, ocasionou menor comprimento e peso ósseos do fêmur e da tíbia nos animais dos grupos desnutridos e reposição, quando comparados ao grupo nutrido. No entanto, a reposição nutricional mostrou-se eficiente, com relação a essas duas variáveis, quando os animais do grupo reposição foram comparados aos animais que foram desnutridos durante todo o experimento. Porém, o comprimento da tíbia não apresentou diferença entre esses grupos, possivelmente porque, como a placa de crescimento da tíbia é a que se desenvolve mais rapidamente no animal <sup>(12)</sup> e existe relação entre taxa de condrogênese e crescimento ósseo longitudinal <sup>(27)</sup>, é provável que os condrócitos das tíbias do grupo reposição não sofreram tanta influência da reposição de uma dieta normoprotéica a ponto de interferir sobre o comprimento longitudinal das mesmas. Já o peso das mesmas foi influenciado pela reposição demonstrando que a supressão do crescimento ósseo longitudinal em virtude da desnutrição resultou muito mais pela diminuição na quantidade de osso formado do que devido a uma alteração no conteúdo mineral <sup>(28)</sup>. Estudos anteriores também demonstraram comprometimento na formação e na

calcificação da matriz óssea de animais desnutridos <sup>(4)</sup> e, em conseqüência, menor comprimento <sup>(4,13,29,30)</sup> e peso ósseo <sup>(29)</sup>, ratificando-se, assim, os efeitos da desnutrição sob os processos de desenvolvimento e crescimento dos ossos longos <sup>(29)</sup>, sendo o período pós-natal, o período crítico de desenvolvimento dos ossos longos <sup>(4)</sup>, período este em que foi aplicada a restrição protéica do presente estudo.

A reposição de uma dieta normoprotéica acarretou maior comprimento ósseo no grupo reposição, quando comparado o grupo desnutrido, estando de acordo com experimentos anteriores <sup>(13)</sup>. Porém, a reposição mostrou-se incompleta, uma vez que não foi possível se atingir o comprimento ósseo do grupo nutrido <sup>(13,30)</sup>. Possivelmente o período de reposição (14 dias) utilizado no presente estudo, bem como o de estudos prévios <sup>(13,30)</sup>, não foi suficiente para que o osso pudesse atingir o seu comprimento adequado <sup>(13)</sup>.

A contagem no número de condrócitos proliferativos e hipertróficos demonstrou que os animais do grupo desnutrido apresentaram redução no número dessas células em comparação ao grupo nutrido e reposição, corroborando com estudos prévios nos quais a redução no número dessas células foi decorrente da desnutrição <sup>(29)</sup> ou mesmo de um período curto de jejum <sup>(11,12)</sup> em comparação ao grupo nutrido <sup>(11-13,29)</sup> e reposição <sup>(13)</sup>. Porém, não se observou diferença no número de condrócitos (proliferativos e hipertróficos) entre os animais dos grupos nutrido e reposição semelhantemente a um estudo recente <sup>(13)</sup> demonstrando que, com relação a essas variáveis, houve uma resposta de recuperação completa.

Em conclusão, a desnutrição protéica aplicada no período neonatal ocasionou prejuízo no crescimento somático, na maturação da placa epifisária e no crescimento ósseo de ratos jovens. Entretanto, foi demonstrado que a reposição com uma dieta normoprotéica promovida ainda no período de crescimento ósseo acelerado mostrou ser capaz de atenuar os efeitos da desnutrição sob o crescimento somático e do tecido ósseo. Além disso, promoveu um crescimento de recuperação completo com relação ao número de condrócitos, uma vez que o número dessas células apresentou-se maior do que no grupo desnutrido e não diferiu do grupo nutrido. Assim sendo, foi demonstrado que é possível o organismo responder a um crescimento de recuperação, embora necessite de um período de reposição nutricional suficiente para que o mesmo tenha condições de atingir completamente seu potencial genético.

**Fonte financiadora:** CAPES

**Declaração de conflitos de interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## **REFERÊNCIAS**

1. Hsueh AM, Simonson M, Chow BF, Hanson HM. The importance of the period dietary restriction of the dam on behavior and growth in the rat. *J Nutr* 1974; 104: 37-46.
2. Oliveira JC, Silva APS, Barbosa FB. Avaliação da evolução ponderal e homeostasia glicídica de ratos submetidos à desnutrição protéica lactacional. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte Expressão, Mossoró, 2003; 34(1-2):53-60.

3. Schultze MO. Effects of malnutrition in early life on subsequent growth and reproduction of rats. *J Nutr* 1954; 25-33.
4. Nakamoto T, Miller SA. Physical and biochemical changes of the mandible and long bone in protein-energy malnourished newborn rats. *J Nutr* 1979; 109: 1477-1482.
5. Guzmán C, Cabrera R, Cárdenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* 2006; 572 (1): 97-108.
6. Abad V, Uyeda JA, Temple HT, De Luca F, Baron J. Determinants of spatial polarity in the growth plate. *Endocrinology* 1999; 140: 958–62.
7. Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85:715-726.
8. Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O *et al.* The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 2002; 143: 1851–1857.
9. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine Regulation of the Growth Plate. *Horm Res* 2005; 64:157–165.
10. Prentice A, Bonjour JP, Branca F, Cooper C, Flynn A, Garabedian M *et al.* PASSCLAIM1 – Bone health and osteoporosis *Eur J Nutr* 2003; 42 [Suppl 1] : I/28–I/49.

11. Heinrichs C, Colli M, Yanovski JA, Laue L, Gerstl NA, Kramer AD *et al.* Effects of fasting on the growth plate: Systemic and local mechanisms. *Endocrinology* 1997; 138 (12): 5359–5365.
12. Farnum CE, Lee AO, O'hara K, Wilsman NJ. Effect of short-term fasting on bone elongation rates: an analysis of catch-up growth in young male rats. *Pediatr Res* 2003; 53: 33–41.
13. Even-Zohar N, Jacob J, Amariglio N, Rechavi G, Potievsky O *et al.* Nutrition-induced catch-up growth increases hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  RNA levels in the growth plate. *Bone* 2008; 42: 505–515.
14. Monte CMG. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. *J Pediatr* 2000; 76 (Supl.3): S285-S297.
15. Mosier Jr HD. Failure of compensatory (catch-up) growth in the rat. *Pediatr Res* 1971; 5: 59-63.
16. Baron J, Klein KO, Yanovski JA, Novosad JA, Bacher JD, Bolander ME, Cutler Jr GB. Induction of growth plate cartilage ossification by basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1994; 135: 2790-2793.
17. Boersma B, Wit JM. Catch-up Growth. *Endocr Rev* 1997; 18(5): 646–661.
18. Nilsson O, Baron J. Fundamental limits on longitudinal bone growth: growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Endocrinology and Metabolism* 2004; 15 (8): 370-374.
19. Hunziker EB, Schenk RK. Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J Physiol* 1989; 414:55-71.

20. Hunziker EB, Kapfinger E, Saager C. Hypertrophy of growth plate chondrocytes in vivo is accompanied by modulations in the activity state and surface area of their cytoplasmic organelles. *Histochem Cell Biol* 1999; 112:115–123.
21. Roach HI, Mehta G, Oreffo ROC, Clarke NMP, Cooper C. Temporal Analysis of Rat Growth Plates: Cessation of Growth with Age Despite Presence of a Physis. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:373–383.
22. Committee on Laboratory Animal Diets /Assembly of Life Sciences. National Research Council. Control of diet in laboratory animal experimentation. *Nutr Abstr Rev* 1979; 40(1):413-419.
23. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents, final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of AIN-76A. *J Nutr.* 1993; 123: 1939 - 1951.
24. Passos MCF, Ramos CF, Teixeira CV, Moura EG. Comportamento alimentar de ratos adultos submetidos à restrição protéica cujas mães sofreram desnutrição durante a lactação. *Rev Nutr, Campinas*, 2001; 14 (suplemento): 7-11.
25. Gurmini J, Cecílio WAC, Schuler SL, Olandoski M, Noronha L. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *J Bras Patol Med Lab* 41 (4): 271-278, 2005.

26. Golstein RS, Bond JT. The effect of maternal protein deprivation on renal development and function in neonatal rats. *J Nutr* 1979; 109:949-957.
27. De Luca F. Impaired Growth Plate Chondrogenesis in children with chronic illnesses. *Pediatr Res* 2006; 59: 625–629.
28. Nakamoto T, Miller SA. Effect of protein-energy malnutrition on the growth of mandible and long bone in newborn male and female rats. *J Nutr* 1977; 107(6):983-989.
29. Platt BS, Stewart RJC. Transverse trabeculae and osteoporosis in bones in experimental protein -calorie deficiency. *Br J Nutr*. 1962; 16:483-495.
30. Rol De Lama MA, Pérez-Romero A, Tresguerres JAF, Hermanussen M, Ariznavarreta C. Recombinant human growth hormone enhances tibial growth in peripubertal female rats but not in males. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 517–523.

## **Títulos e legendas das Figuras**

**Figura 1-** Evolução ponderal

**Legenda da Figura 1** – Grupos: GN (n=10), GD (n=10) e GR (n=10). \* indica diferença em relação ao GN ( $p < 0,05$ ) e † indica diferença em relação ao GR ( $p < 0,05$ ), (Teste t - Student, Mann-Whitney).

**Tabela 1.** Comprimento e peso ósseos do fêmur e da tíbia em animais aos 36 dias de vida.

Variáveis	Osso	Nutrido	Desnutrido	Reposição
		(GN)	(GD)	(GR)
Comprimento ósseo (mm)	fêmur	23,95±0,8	22,07±1,03 * †	23,30±0,59 *
	tíbia	29,40±0,46	27,09±1,03 *	28,10±1,05*
Peso ósseo (g)	fêmur	0,37±0,03	0,26±0,03 * †	0,31±0,02 *
	tíbia	0,31±0,03	0,21±0,03 * †	0,25±0,01 *

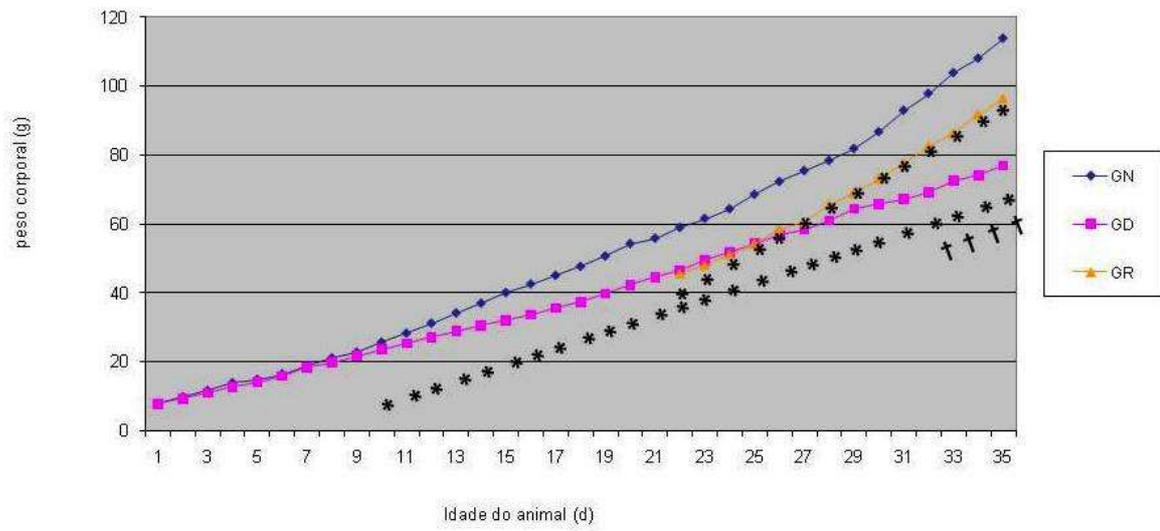
Grupos: GN (n=10), GD (n=10) e GR (n=10). \* indica diferença em relação ao GN e † indica diferença em relação ao GR. Os valores estão expressos em M±DP. Teste t – Student.

**Tabela 2.** Parâmetros Histomorfométricos avaliados na placa epifisária do fêmur em animais de 36 dias de vida.

Variáveis	Nutrído (GN)	Desnutrido (GD)	Reposição (GR)
Nº de condrócitos proliferativos	9,98±1,06	5,71±0,83*†	8,22±2,00
Nº de condrócitos hipertróficos	4,18±0,37	1,65±0,84*†	3,25±0,93

Grupos: GN (n=10), GD (n=10) e GR (n=10). \* indica diferença em relação ao GN e † indica diferença em relação ao GR. Os valores estão expressos em M±DP. Teste t – Student.

Figura 1



## 7. CONCLUSÕES

A desnutrição protéica aplicada no período neonatal:

- Ocasionou prejuízo no crescimento somático, na maturação da placa epifisária e no crescimento ósseo de ratos jovens.

A reposição com uma dieta normoprotéica promovida ainda no período de crescimento ósseo acelerado:

- Mostrou ser capaz de atenuar os efeitos da desnutrição sob o crescimento somático e do tecido ósseo.
- Promoveu um crescimento de recuperação completo com relação ao número de condrócitos, uma vez que o número dessas células apresentou-se maior do que no grupo desnutrido e não diferiu do grupo nutrido.
- Demonstrou que é possível o organismo responder a um crescimento de recuperação, embora necessite de um período de reposição nutricional suficiente para que o mesmo tenha condições de atingir completamente seu potencial genético.

## **8. PERSPECTIVAS**

- Avaliar essas variáveis em um período maior de reposição nutricional;
- Realizar, neste modelo, a dosagem de hormônios que influenciam o crescimento da placa epifisária;
- Avaliar, neste modelo, os efeitos da aplicação do exercício físico.

## 9.REFERÊNCIAS

- ABAD, V. *et al.* The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. **Endocrinology**, n. 143, p. 1851–1857, 2002.
- ABAD, V. *et al.* Determinants of spatial polarity in the growth plate. **Endocrinology**, n. 140, p. 958–62, 1999.
- BALLOCK, R. T.; O'KEEFE, R. J. The biology of the growth plate. **J Bone Joint Surg Am**, n. 85, p. 715-726, 2003.
- BARON, J. *et al.* Induction of growth plate cartilage ossification by basic fibroblast growth factor. **Endocrinology**, n. 135, p. 2790-2793, 1994.
- BOERSMA, B.; WIT, J. M. Catch-up Growth. **Endocr Rev**, v. 18, n. 5, p. 646–661, 1997.
- COMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL DIETS. ASSEMBLY OF LIFE SCIENCES. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Control of diet in laboratory animal experimentation. **Nutr Abstr Rev**, v. 40, n. 1, p. 413-9, 1979.
- CRUICKSHANK, J. *et al.* **J Endocrinol**, n. 184, p. 543–553, 2005.
- DE LUCA, F. Impaired Growth Plate Chondrogenesis in children with chronic illnesses. **Pediatr Res**, n. 59, p. 625–629, 2006.
- EVEN-ZOHAR, N. *et al.* Nutrition-induced catch-up growth increases hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  RNA levels in the growth plate. **Bone**, n. 42, p. 505–515, 2008.
- FARNUM, C. E. *et al.* Effect of short-term fasting on bone elongation rates: an analysis of catch-up growth in young male rats. **Pediatr Res**, n. 53, p. 33–41, 2003.
- GAT-YABLONSKI, G. *et al.* Leptin reverses the inhibitory effect of caloric restriction on longitudinal growth. **Endocrinology**, n. 145, p. 343-350, 2004.
- HARTMANN, C. Skeletal Development - Wnts Are in Control. **Mol Cells**, v. 24, n. 2, p. 177-184, 2007.
- HEINRICHS, C. *et al.* Effects of fasting on the growth plate: Systemic and local mechanisms. **Endocrinology**, v. 138, n. 12, p. 5359–5365, 1997.
- HUNZIKER, E.B.; KAPFINGER, E.; SAAGER, C. Hypertrophy of growth plate chondrocytes in vivo is accompanied by modulations in the activity state and surface area of their cytoplasmic organelles. **Histochem Cell Biol**, n. 112, p. 115–123, 1999.
- HUNZIKER, E. B.; SCHENK, R. K. Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. **J Physiol**, n. 414, p. 55-71, 1989.
- HSUEH, A. M. *et al.* The importance of the period dietary restriction of the dam on behavior and growth in the rat. **J Nutr**, n. 104, p. 37-46, 1974.

- KEMBER, N. F. Cell population kinetics of bone growth: the first ten years of autoradiographic studies with tritiated thymidine. **Clin Orthop**, n. 76, p. 213–230, 1971.
- KOBAYASHI, T. et al. Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. **PNAS**, v. 105, n. 6, p. 1949–1954, 2008.
- KRONENBERG, H. M. Developmental regulation of the growth plate. **Nature**, n. 423, p. 332–336, 2003.
- MARQUES, R. F. S. V.; LOPEZ, F. A.; BRAGA, J. A. P. O crescimento de crianças alimentadas com leite materno exclusivo nos primeiros 6 meses de vida. **Rev Chil Pediatr**, v. 77, n. 5, p. 529-530, 2006.
- MORAES, V. V. Efeitos da desnutrição precocemente corrigida na morfologia da epífise de crescimento de coelhos (Nova Zelândia). 139f. Dissertação (mestrado)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- MOSIER JR, H. D. Failure of compensatory (catch-up) growth in the rat. **Pediatr Res.**, n. 5, p. 59-63, 1971.
- NILSSON, O.; BARON, J. Fundamental limits on longitudinal bone growth: growth plate senescence and epiphyseal fusion. **Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 8, p. 370-374, 2004.
- NILSSON, O. *et al.* Endocrine Regulation of the Growth Plate. **Horm Res**, n. 64, p. 157–165, 2005.
- OLIVEIRA, J.C; SILVA, A.P.S.; BARBOSA, F.B. Avaliação da evolução ponderal e homeostasia glicídica de ratos submetidos à desnutrição protéica lactacional. *Universidade do Estado do Rio Grande do Norte Expressão*, Mossoró, v. 34, n. 2, p. 53-60, 2003.
- PRAZERES, F.G. *et al.* Exercício físico, crescimento e desenvolvimento: estudo em ratos jovens desnutridos pela dieta básica regional (DBR) e recuperados nutricionalmente. **Rev Bras Educ Fís Esp**, v. 18, n. 1, p. 7-16, 2004.
- PRENTICE, A. *et al.* PASSCLAIM1 – Bone health and osteoporosis **Eur J Nutr** 42 [Suppl 1]: I/28–I/49, 2003.
- PRENTICE, A. *et al.* Nutrition and bone growth and development. **Proc Nutr Soc**, n. 65, p. 348–360, 2006.
- REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents, final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of AIN-76A. **J Nutr**, v.123, p. 1939 - 1951, 1993.
- ROACH, H. I. *et al.* Temporal Analysis of Rat Growth Plates: Cessation of Growth with Age Despite Presence of a Physis. **J Histochem Cytochem**, n. 51, p. 373–383, 2003.

ROL DE LAMA, M. A. *et al.* Recombinant human growth hormone enhances tibial growth in peripubertal female rats but not in males. **Eur J Endocrinol**, n. 142, p. 517–523, 2000.

TAKANO, H. *et al.* Normal bone growth requires optimal estrogen levels: negative effects of both high and low dose estrogen on the number of growth plate chondrocytes. **Tohoku J Exp Med**, v. 214, n. 3, p. 269-80, 2008.

VAN DER EERDEN, B. C. J.; KARPERIEN, M.; WIT, M. Systemic and Local Regulation of the Growth Plate. **Endocr Rev**, v. 24, n.6, p.782–801, 2003.

WALLIS, G. A. Bone growth: Coordinating chondrocyte differentiation. **Curr Biol**, v.6, n.12, p.1577–1580, 1996.

WEISE, M. *et al.* Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. **PNAS**, v. 98, n.12, p.6871–6876, 2001.

**ANEXOS**

**ANEXO 1 – Aceite do trabalho para apresentação na FeSBE.****XXIV Reunião Anual da FeSBE - Carta de Aceite**

Segunda-feira, 6 de Julho de 2009 15:41

De: "sistemafesbe@fesbe.org.br" <sistemafesbe@fesbe.org.br>

[Adicionar remetente à lista de contatos](#)

Para: karinnacs@yahoo.com.br



Sr(a) **Tâmara Kelly Delgado Paes Barreto**

São Paulo, 15 de junho de 2009.

Comunicamos que o seu resumo intitulado **ANÁLISE DO COMPRIMENTO E PESO DE FÊMUR E TÍBIA DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À RENUÇÃO PROTÉICA NA FASE DE CRESCIMENTO ÓSSEO ACELERADO**. de autoria **Barreto, T.K.D.P.<sup>1</sup>, Silva, K.C.<sup>2</sup>, Silva, C.R.S.<sup>1</sup>, Bizarria, F.S.<sup>1</sup>, Silva, R.J.<sup>1</sup>, Costa, R.D.C.S.<sup>1</sup>, Moraes, S.R.A.de<sup>1</sup>** <sup>1</sup>Departamento de Anatomia, UFPE Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 <sup>2</sup>Mestrado em Patologia, UFPE Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 foi aceito para apresentação sob a forma de poster na XXIV Reunião Anual da FeSBE, que será realizada em Águas de Lindóia/SP- Brasil, de 19/08/2009 a 22/08/2009.

**Número de Apresentação:** 33.016

**Data da Apresentação:** 19 / 8 / 2009 **Hora:** horario inicio 16h00 e horario fim 18h00

Atenciosamente,  
Comissão Organizadora.

## ANEXO 2– Parecer final do Comitê de Ética em Experimentação Animal.

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 08 de maio de 2008

Ofício nº 24/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Para: **Profª Sílvia Regina Arruda de Moraes**  
Departamento de Anatomia CCB  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.040689/2007-10

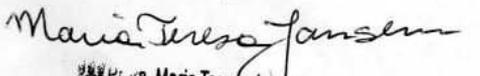
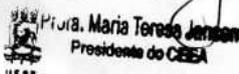
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado “EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O CRESCIMENTO DA PLACA EPIFISÁRIA E A FORMAÇÃO DE OSSOS LONGOS EM RATOS”.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

*Maria Teresa Jansen*  
  
  
 Maria Teresa Jansen  
 Presidente do CEEA

**Comprovante de submissão do artigo à Revista Brasileira de Reumatologia****R 129****Sexta-feira, 7 de Agosto de 2009 13:52****De: "RBR" <amaral@unifesp.br>****Adicionar remetente à lista de contatos****Para: "Karina Carvalho" <karinnacs@yahoo.com.br>**

R 129

Como a desnutrição protéica ou a privação alimentar podem interferir no crescimento da placa epifisária de animais?

Karina de Carvalho da Silva, Camilla Rodrigues de Souza Silva, Rita de Cássia da Silva Costa, Sílvia Regina Arruda de Moraes

Dra. Karina

Recebemos seu manuscrito e cadastramos conforme acima.

Atenciosamente,  
Rogério Amaral